



DE 196 03 996 C 2

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 196 03 996 C 2

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
G 01 N 33/48  
G 01 N 1/04  
G 01 N 1/28  
B 07 C 5/36  
B 23 K 26/00  
C 12 Q 1/00  
C 12 N 13/00  
C 12 M 1/42

21 Aktenzeichen: 196 03 996.7-52  
22 Anmeldetag: 5. 2. 1996  
43 Offenlegungstag: 14. 8. 1997  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 29. 8. 2002

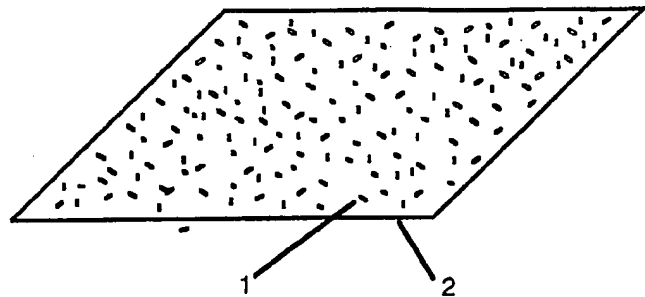
Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:  
P.A.L.M.GmbH Mikrolaser-Technologie, 82515  
Wolfratshausen, DE  
  
74 Vertreter:  
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539  
München

72 Erfinder:  
Dießel, Edgar, Dr., 50679 Köln, DE; Stebani, Jürgen,  
Dr., 47800 Krefeld, DE; Reihs, Karsten, Dr., 50679  
Köln, DE; Schütze, Karin, Dr., 82515  
Wolfratshausen, DE  
  
56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
DE 35 09 273 A1  
US 52 11 805  
US 46 24 915  
JP 07-0 31 459 A  
  
Cytometry 12 (1991), S. 497-504;  
Journal of Biotechnology 35(1994), S. 109-120;  
Journal of Microscopy 167(1992), S. 127-151;

54 Sortierverfahren für planar ausgebrachte biologische Objekte mit Laserstrahlen

57 Verfahren zum Separieren und Sortieren von biologischen Objekten, die auf einem planaren Träger (2) angeordnet sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein Objektfeld (12) des Trägers (2), auf dem sich ein selektiertes biologisches Objekt (10) befindet, mit einem Laserstrahl (6) ausgeschnitten und durch einen Laser-induzierten Transportprozess auf einen in der Nähe des Trägers (2) und oberhalb oder unterhalb des Trägers (2) angeordneten Auffänger (5) übertragen wird.



DE 196 03 996 C 2

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Sortieren und Separieren für einzelne biologische Objekte. Die Objekte sind hierbei auf einem festen planaren Träger nebeneinander angeordnet. Mit diesem Verfahren können aus einer sehr großen Zahl von Objekten (z. B.  $10^5$ – $10^9$ ) einzelne Objekte räumlich abgetrennt und ausgesondert werden. Die Abtrennung von gehäuftten Zellen als Gesamteinheit ist ebenso möglich. Ebenso kann das Verfahren zur Separation von spezifischen Zellen aus Gewebeschnitten eingesetzt werden. Voraussetzung dafür ist die vorherige Erkennung und Selektion der betreffenden Objekte aufgrund spezifischer analytischer Eigenschaften (z. B. durch Fluoreszenzspektroskopie oder durch radioaktive Markierung). Unter "biologischen Objekten" werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung vor allem (lebende) biologische Zellen verstanden.

[0002] Zur Separation einzelner biologischer Objekte lassen sich Objekte mit optischen Methoden, wie der optischen Pinzette (Optical Tweezer), in einer wässrigen Lösung bewegen (K. Schütze, A. Clement-Sengewald, *Nature*, 667 (Vol. 368) 1994). Das diesen optischen Pinzetten (Optical Tweezer) zugrundeliegende Prinzip bzw. der Aufbau entsprechender Laser-Mikrodissektions- oder Laser-Mikromanipulatorvorrichtungen ist beispielsweise auch in "Application of Laser Optical Tweezers in Immunology and Molecular Genetics" (S. Seeger, S. Monajembaslai, K.-J. Hutter, G. Futterman, J. Wolfram, K. O. Greulich), *Cytometry* 12 (1991), Seiten 497–504 oder in "Laser micromanipulators for biotechnology and genome search" (N. Ponelies, J. Scheef, A. Harim, G. Leitz, K. O. Greulich), *Journal of Biotechnology* 35 (1994), Seiten 109–120 und in "The light microscope on its way from an analytical to a preparative tool" (K. O. Greulich, G. Weber), *Journal of Microscopy* 167 (1992), Seiten 127–151 sowie in JP 07-031 459 A beschrieben. Aufgrund der geringen Kraftübertragung ist diese Methode auf Objekte beschränkt, die sich frei in der Lösung bewegen können. Da sich die sortierten wie die unsortierten Objekte in der gleichen Lösung befinden, ist eine getrennte Kultivierung nur mit zusätzlichem Aufwand erzielbar. Für eine getrennte Kultivierung müssen diese Zellen mit einer anderen Methode, wie z. B. mit Nadeln, abgetrennt werden. Mit Mikromanipulatoren bewegte Nadeln, an denen die Zellen adherieren, werden auch als alleinige Methode eingesetzt. Hierbei werden die Zellen direkt berührt und könnten somit mechanisch belastet werden. Beide Methoden sind verhältnismäßig zeitintensiv, so daß sie nicht nur zur Bearbeitung einer Vielzahl von Objekten geeignet sind.

[0003] Zur Separierung einzelner Zellen aus einer großen Zahl ( $> 10^6$ ), in einer Flüssigkeit dispergierter, biologischer Objekte geeignete Trenn- bzw. Sortierapparate sind kommerziell erhältlich. Während bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS = Fluorescence activated Cell Sorter) elektrostatische Prinzipien zur räumlichen Separation zum Einsatz kommen, arbeitet der magnetisch aktivierte Zellsortierer (MACS = Magnetic Activated Cell Sorter) mit magnetischen Kräften. Hierbei liegen die Zellen jedoch nicht auf einem planaren Träger nebeneinander. Überdies haben beide Methoden den Nachteil, daß sich einzelne Objekte nur eingeschränkt (FACS) oder überhaupt nicht getrennt voneinander absondern lassen (MACS).

[0004] Die vorgestellten Methoden können keine Zellen aus einem Zellverband wie etwa einem Gewebe lösen.

[0005] Ferner sind unter dem Namen "Ablative Photodecomposition" Verfahren bekannt, bei denen mit gepulsten UV-Lasern, insbesondere mit Excimer-Lasern, ein gezielter Materialabtrag bei Polymeren erfolgt. Diese Verfahren kön-

nen im weitesten Sinne als Ätzverfahren angesehen werden. Ein ähnliches Verfahren, bei dem jedoch ein kontinuierlich betriebener UV-Laser verwendet wird, wird in der 5 211 805 beschrieben. Dieses Verfahren soll sich zur industriellen Bearbeitung von technischen Polymeren und zur biomedizinischen Behandlung von biologischem Gewebe eignen. Hiermit ist ein Sortierprinzip verwandt, das mit Laserstrahlen die auf einem Träger befindlichen unerwünschten biologischen Objekte mit hohen Strahlungsdosen zerstört, während die selektierten (erwünschten) Objekte zurück bleiben (US 4 624 915). Dieser Prozeß ist verhältnismäßig aufwendig, um einzelne Objekte aus großen Populationen zu selektieren.

[0006] Aus der DE 35 09 273 A1 ist hinsichtlich der Bearbeitung von biologischem Material mit gepulsten Lasern bekannt, die Laserpulse bis auf einen durch Beugungserscheinungen begrenzten Querschnitt zu fokussieren, wobei die Beugungsmaxima n-ter Ordnung ( $n = 1, 2, 3 \dots$ ) der Laserpulse zum Schneiden des biologischen Materials genutzt werden. Hierzu kann als Energiequelle und Pumplaser ein Excimer-Laser mit einer Wellenlänge im ultravioletten Bereich verwendet werden, wobei durch Nachschalten eines Farbstofflasers das Lasersystem in seiner Wellenlänge abstimmbar wird.

[0007] Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht in der räumlichen Separation einzelner biologischer Objekte, die nebeneinander auf einem planaren Träger ausgebracht sind. Hierbei soll der Vorgang des Absonderns möglichst kurz ( $< 10$  s) sein. Außerdem soll der Prozess sehr zuverlässig und damit in einfacher Weise automatisierbar sein. Gleichzeitig soll die Überlebensfähigkeit der biologischen Objekte in der Regel gewährt bleiben; d. h. die biologischen Objekte sollen durch den Abtrennprozeß nicht geschädigt bzw. beeinträchtigt werden.

[0008] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zum Separieren und Sortieren von auf einem planaren Träger angeordneten biologischen Objekten nach Anspruch 1 gelöst. Die Unteransprüche definieren jeweils bevorzugte und vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung.

[0009] Die obige Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Objektfeld des Trägers, auf dem sich das selektierte biologische Objekt befindet, mit einem Laserstrahl durch Ausschneiden abgetrennt wird und durch einen Laser-induzierten Transportprozess auf ein oberhalb oder unterhalb des Trägers und in der Nähe des Trägers angeordneten Auffänger übertragen wird. Die erfindungsgemäße Lösung besteht also darin, daß die biologischen Objekte in einem kleinen, vorzugsweise kreisförmigen Umfeld mitsamt dem Träger von einem Laserstrahl ausgeschnitten werden und anschließend aus dem Träger heraus auf einen in der Nähe angebrachten Auffänger geschleudert werden. Es wurde beobachtet, daß die herausgetrennten Objektfelder dabei stets in Richtung des Laserstrahls beschleunigt werden. Eine physikalische Erklärung für diesen Laser-induzierten Transportprozeß liegt möglicherweise in dem photokinetischen Impuls, der von dem Laserstrahl auf das ausgeschnittene Objektfeld übertragen wird und damit für die Beschleunigung verantwortlich ist. Die räumliche Separation der biologischen Objekte beruht also bei diesem Prozeß auf dem Ausschneiden der gewünschten Objektfelder mit den vorher selektierten Objekten und ihrem Abtransport zu einem in der Nähe befindlichen Auffängersubstrat.

[0010] Das Ausschneiden des Objektfeldes kann vorteilhaft in der Weise erfolgen, daß der Laserstrahl durch eine Relativbewegung von Laserstrahl und einer planaren Trägerfolie, auf welcher die biologischen Objekte angeordnet sind, auf einer geschlossenen, das Objektfeld einschließen-

den Kurve um das biologische Objekt herumgeführt wird. Alternativ kann aber die Abtrennung eines Objektfeldes in Analogie zu einem Stanzprozeß auch so durchgeführt werden, dass der das Objektfeld einschließende Schnittbereich durch eine mit dem Laserstrahl beleuchtete, auf die Trägerfolie abgebildete Schlitzmaske simultan belichtet wird.

[0011] Der Auffänger, welcher nachfolgend auch als Auffängersubstrat bezeichnet wird, soll in unmittelbarer Nähe der Trägerfolie angeordnet werden, so dass die Transportwege bei dem Separationsprozess kurz sind. Gute Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Entfernung 0,5 bis 10 mm, vorzugsweise 1 bis 3 mm betrug.

[0012] Der Durchmesser des Objektfeldes mit dem selektierten Objekt kann aufgrund des außerordentlich präzisen Schnittvorgangs sehr klein, d. h. in einem Bereich von 10 µm bis 20 µm, gewählt werden. Zum Ausschneiden wird vorzugsweise ein UV-Laser verwendet, wobei der Laserstrahl fokussiert auf die Trägerfolie abgebildet wird.

[0013] Die Trägerfolie besteht dabei aus einer UV-absorbierenden Polymerfolie mit einer Dicke zwischen 5 µm und 15 µm, deren Absorptionsverhalten an die Wellenlänge des UV-Lasers angepasst ist, also zumindest in der Umgebung der Laserwellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzt. Als besonders geeignet haben sich Polymerfolien erwiesen, die mindestens 5 Gew.-% eines aromatischen oder teilaromatischen Polykondensats enthalten. Die geometrische Form des Auffängersubstrats ist relativ unkritisch. Geeignet ist z. B. eine relativ dicke Folie oder Platte, die im Abstand von 0,5 bis 10 mm oberhalb oder unterhalb von der Trägerfolie parallel dazu angebracht wird. Das Auffängersubstrat kann aber auch als topfförmiger Behälter ausgebildet sein. Insbesondere wird eine Mikrotiterplatte mit 90 bis 500 Vertiefungen (Wells) zur Aufnahme der Proben empfohlen.

[0014] Gemäß einer speziellen Ausführungsform ist die Platte oder Folie mit einer adhäsiven Schicht versehen. Durch eine solche Klebeschicht können die abgeschleuderten Objektfelder auf dem Auffängersubstrat fixiert werden.

[0015] Zur Erkennung und Selektion der gewünschten biologischen Objekte auf der Trägerfolie wird vorzugsweise die Methode der Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt.

[0016] Alternativ können die biologischen Objekte mit Hilfe bekannter histochemischer Farbreaktionen oder morphologischer visuell wahrnehmbarer Veränderungen erkannt und anschließend selektiert werden.

[0017] Gemäß einer Weiterentwicklung werden die biologischen Objekte mit einem flüssigen, für die Laserstrahlung durchsichtigen Nähr- oder Puffermedium beschichtet. Der Schnittvorgang und der Ablöseprozess des selektierten Objektfeldes werden dadurch nicht beeinträchtigt.

[0018] Das erfindungsgemäße Separierverfahren wird vorteilhaft in einem abgeschlossenen System durchgeführt. Zu diesem Zweck wird sowohl die Trägerfolie mit den zu sortierenden Objekten, als auch das Auffängersubstrat in einem geschlossenen Behälter untergebracht, der ein UV-transparentes Fenster für den Laserstrahl besitzt.

[0019] Der Vorteil des Laser-induzierten Separationsprozesses von Zellen besteht in der gezielten und gleichzeitig schnellen Manipulation von einzelnen Zellen im Vergleich zum Stand der Technik. Aufgrund des einfachen Prinzips ist der Prozeß sehr robust und einfach zu handhaben und eignet sich daher zur Computergestützten automatischen Separation einer Vielzahl von biologischen Objekten. Ein unter sicherheitstechnischen Aspekten wichtiger Vorteil liegt ferner darin, daß der Separationsprozess in einem hermetisch abgeschlossenen System durchgeführt werden kann, so daß die Umgebung vor pathogenen Zellen geschützt werden kann. Außerdem werden die Zellen von Verunreinigungen aus der Umgebung geschützt.

[0020] Das Verfahren eignet sich prinzipiell zum Einsatz in Teilgebieten der Biotechnologie, wo spezifische Zelltypen angereichert werden sollen. Beispielsweise können mit dem Green fluorescent Protein (GFP) als Reportergen transgenisierte Zellen identifiziert werden. Marshall et al. (Neuron, Vol. 14, 211-215 (1995)) benutzen z. B. die GFP-Methode, um die Expression von Ionenkanälen abzuschätzen. Gemäß einer weiteren Anwendung können für neurologische Experimente aus Gehirngewebeschnitten z. B. Gliazellen separiert werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Antikörper benutzt, um diese Zellen zu identifizieren. Zur Diagnose könnten aus Gewebeschnitten Tumorzellen, die z. B. durch morphologische Veränderungen auffallen, isoliert werden. Hierzu wird der Gewebeschnitt auf die Trägerfolie gelegt. Die herauszupräparierende Zelle wird durch einen Schnitt durch das Gewebe und die Substratfolie separiert, so daß Zelle plus Substratmaterial gemeinsam auf eine Unterlage transferiert werden. Diese Zellen werden anschließend histologisch analysiert. Darüber hinaus können Bakterien mit spezifischen Eigenschaften wie z. B. Zitronensäureproduzenten auf ihre Leistungsfähigkeit hin durch geeignete pH-sensitive Farbumschläge eines geeigneten Indikators erkannt und anschließend aussortiert werden.

[0021] Im folgenden wird das Verfahren an Hand von Zeichnungen und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

[0022] Es zeigen:

[0023] Fig. 1 schematisch eine Trägerfolie mit adherierten Bakterien

[0024] Fig. 2 den prinzipiellen Aufbau einer Apparatur zur Durchführung des Verfahrens

[0025] Fig. 3 und 4 das zugrundeliegende Sortierprinzip.

[0026] Fig. 1 zeigt beispielsweise eine Bakterienpopulation 1, die planar auf einer 5 µm starken Polyarylatfolie 2 (Trägerfolie) ausgebracht ist. Zum Sortiervorgang wird die Trägerfolie 2 in einen Schiebetisch 3 eingelegt und mechanisch fixiert. Dieser Tisch befindet sich gem. Fig. 2 als Objektisch in einem inversen Mikroskop 4 und kann z. B. mittels eines Computergesteuerten Schrittmotors in x,y-Richtung (Horizontalebene) positioniert werden. Im Schiebetisch 3 ist ferner gegenüber der Trägerfolie 2 im Abstand von 1,8 mm ein plattenförmiges Auffängersubstrat 5 gehalten. Bei einer Bewegung des Schiebetisches 3 werden also gleichzeitig die Trägerfolie 2 und das Auffängersubstrat 5 senkrecht zum Strahlengang (z-Richtung) im Mikroskop verschoben. Der Schiebetisch 3 mit der Trägerfolie 2 und den darauf befindlichen biologischen Objekten 1, sowie das Auffängersubstrat 5 sind von einem geschlossenen Gehäuse mit einem UV-durchlässigen Fenster für den Laserstrahl umgeben (nicht dargestellt), so daß das Verfahren in einem hermetisch abgeschlossenen System durchgeführt werden kann.

[0027] Als Trägerfolie für die biologischen Objekte wird eine 5 µm bis 15 µm dicke, UV-absorbierende Polymerfolie aus einem Polymer verwendet, das mindestens 5 Gew.-% eines aromatischen oder teilaromatischen Polykondensates, wie z. B. Polycarbonate, Polyurethane, Polyarylate, Copolyester, Polyester-carbonate oder Blends aus diesen Polykondensaten und anderen Thermoplasten enthält.

[0028] Zur räumlichen Trennung einer einzelnen Bakterie aus der ausgebrachten Population wird ein UV-Laserstrahl 6 der Wellenlänge 337 nm eines gepulsten N<sub>2</sub>-Lasers 7 verwendet. Der Laser 7 liefert bei einer maximalen Pulsfrequenz von 20 Hz ca. 300 µJ Strahlenergie. Geeignet sind auch Excimerlaser mit einer Wellenlänge von 193, 248, oder 308 nm oder ein frequenzvervierfacher Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 266 nm oder ein frequenzverdoppelter Ar-Ionenlaser mit Wellenlängen von 244 nm oder 257 nm. Der Laserstrahl 6 wird über einen dielektrischen

Strahlteiler 8 und ein verkleinerndes Mikroskopobjektiv 9 (Verkleinerung 63 $\times$ , Öffnungsverhältnis NA = 0.9) auf die Trägerfolie 2 punktförmig abgebildet. Dieser Punkt hat einen Durchmesser von ca. 5  $\mu$ m.

[0029] Eine kreisförmige bzw. geschlossene Schnittlinie mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu$ m wird um das selektierte Bakterium durch eine entsprechende Bewegung des Schiebetisches 3 in der Horizontalebene erzeugt. Die durch die Schnittlinie definierte Fläche stellt in diesem Fall die Objektfläche dar. Der Laserstrahl bleibt während des nachfolgend beschriebenen Schneidprozesses ortsfest.

[0030] Im Experiment betrug die relative Bahngeschwindigkeit des Laserstrahls zum Ausschneiden einer geschlossenen Fläche 5  $\mu$ m/s. Dabei entstand eine scharfkantige, eng begrenzte Schnittlinie, wobei gleichzeitig mit der Rückkehr des Laserstrahls zum Startpunkt der Schnittlinie ein Abriß der ausgeschnittenen Fläche erfolgte. Diese Fläche wurde nun durch einen Laser-induzierten Transportprozess, dessen physikalische Wirkungsweise im Einzelnen noch nicht geklärt ist, von der Trägerfolie 2 weg auf das darüber befindliche, mit einer adhäsiven Klebeschicht versehene Auffängersubstrat 5 geschleudert und blieb dort haften. Eine andere Möglichkeit besteht darin, als Auffängersubstrat eine handelsübliche Mikrotiterplatte mit z. B. 96 Wells zu verwenden. Unter "Wells" werden in der pharmazeutischen Forschung die in der Mikrotiterplatte befindlichen Aussparungen bzw. kreisrunden Vertiefungen zur Probenaufnahme mit einem Durchmesser von ca. 4 mm und einer Tiefe von ca. 6 mm verstanden.

[0031] Der Sortierprozeß soll noch einmal an Hand der Fig. 3 und 4 veranschaulicht werden. Fig. 3 zeigt ein räumlich zu separierendes Bakterium 10 auf der Trägerfolie 2. Auf Grund der kreisförmigen Bewegung des Schiebetisches 3 ist durch den ortsfesten Laserstrahl 6 beim Schneidprozeß bereits eine Schnittlinie 11 von etwa 5–7  $\mu$ m Breite in der Folie 2 geschrieben worden. In diesem Bereich ist das Folienmaterial komplett abgetragen worden. Unmittelbar nachdem die Schnittlinie 11 zu einem geschlossenen Kreis vervollständigt worden ist, wird das abgetrennte Folienstück (Objektfeld) 12 mit dem darauf befindlichen Bakterium 10 in Richtung des Laserstrahls beschleunigt und wie in Fig. 4 dargestellt, auf das Klebeband 5 (Auffängersubstrat) geschleudert. In der Trägerfolie 2 verbleibt ein kreisrundes Loch 13.

[0032] Anstelle des Schiebetisches kann auch mit einem ruhenden Objektisch gearbeitet und der Laserstrahl mit Hilfe eines in die Laseroptik eingebauten Drehspiegels auf einem Kreis um das selektierte Bakterium herumgeführt werden.

[0033] Voraussetzung für die Laser-Separation ist die vorherige Erkennung und Selektion der aus der Trägerfolie zu entfernenden Objektfelder. Eine in der pharmakologischen Forschung häufig angewandte Methode der Erkennung und Selektion von bestimmten Zellstrukturen ist die Fluoreszenzspektroskopie. Zu diesem Zweck wird ein kommerziell erhältliches Fluoreszenz-Mikroskop eingesetzt. Grundlage ist dabei, daß die für die Selektion vorgesehenen Zellen bzw. Bakterien ein signifikantes Fluoreszenzsignal erzeugen, das als Unterscheidungskriterium herangezogen wird. Mit Hilfe eines mit einem Suchalgorithmus ausgestatteten Scan-Programms kann dann der Schiebetisch 3 so gesteuert werden, daß automatisch nacheinander die Bereiche mit selektierten Bakterien als Objektfelder zentral im Gesichtsfeld des Fluoreszenzmikroskops positioniert und anschließend ausgeschnitten werden.

[0034] Zur Erkennung von biologischen Objekten in Gewebeschnitten können auch die bekannten histologischen Farbreaktionen oder im Mikroskop wahrnehmbare morpho-

logische Veränderungen herangezogen werden.

[0035] Die Trägerfolie 2 kann auch mit einer für die Laserstrahlung durchlässigen Nähr- oder Pufferlösung, z. B. einer PBS-Pufferlösung, beschichtet werden, ohne den Separierprozess zu beeinträchtigen.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Separieren und Sortieren von biologischen Objekten, die auf einem planaren Träger (2) angeordnet sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Objektfeld (12) des Trägers (2), auf dem sich ein selektiertes biologisches Objekt (10) befindet, mit einem Laserstrahl (6) ausgeschnitten und durch einen Laser-induzierten Transportprozess auf einen in der Nähe des Trägers (2) und oberhalb oder unterhalb des Trägers (2) angeordneten Auffänger (5) übertragen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Objekte (1) auf einer planaren Trägerfolie (2) angeordnet sind, wobei mit dem Laserstrahl (6) ein Objektfeld (12) der Trägerfolie (2), auf dem sich das selektierte biologische Objekt (10) befindet, ausgeschnitten wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Laserstrahl (6) auf einer geschlossenen Kurve um das biologische Objekt (10) herumgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein das selektierte biologische Objekt (10) einschließender Schnittbereich durch eine mit dem Laserstrahl (6) beleuchtete, auf den planaren Träger (2) abgebildete Schlitzmaske simultan belichtet wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das selektierte biologische Objekt (10) nach dem Ausschneiden über eine Distanz von 0,5–10 mm, vorzugsweise über eine Distanz von 1–3 mm, zu dem Auffänger (5) transportiert wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Laserstrahl (6) ein Objektfeld (12), auf dem sich das selektierte biologische Objekt (10) befindet, mit einem Durchmesser von 10  $\mu$ m 50  $\mu$ m ausgeschnitten und durch den Laser-induzierten Transportprozess auf den Auffänger (5) übertragen wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für das Ausschneiden des biologischen Objekts (10) und für den Laser-induzierten Transportprozess ein UV-Laser (7) verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Objekte (1) auf einer planaren Trägerfolie (2) angeordnet sind, wobei als Trägerfolie (2) eine UV-Licht absorbierende Polymerfolie mit einer Dicke von 5  $\mu$ m–15  $\mu$ m verwendet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer der Trägerfolie (2) mindestens 5 Gew.-% eines aromatischen oder teilaromatischen Polykondensats enthält.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Auffänger (5) eine Folie mit einer adhäsiven Oberfläche verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–9, dadurch gekennzeichnet, daß als Auffänger (5) eine Mikrotiterplatte mit 90 bis 500 Vertiefungen (Wells) zur Aufnahme der Proben verwendet wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das selektierte biologische Objekt (10) zunächst mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie erkannt und anschließend selektiert wird.

5

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß das selektierte biologische Objekt (10) in einem Gewebeschnitt mit Hilfe histochemischer Farbreaktionen oder morphologischer visuell wahrnehmbarer Veränderungen erkannt und anschließend selektiert wird.

10

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger (2) eine Trägerfolie, welche mit einem flüssigen, für die Laserstrahlung durchlässigen Nähr- oder Puffermedium beschichtet wird, verwendet wird.

15

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl der Träger (2) mit den zu sortierenden biologischen Objekten (1) als auch der Auffänger (5) in einem geschlossenen Behälter untergebracht sind, welcher ein UV-transparentes Fenster für den Laserstrahl (6) besitzt.

20

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

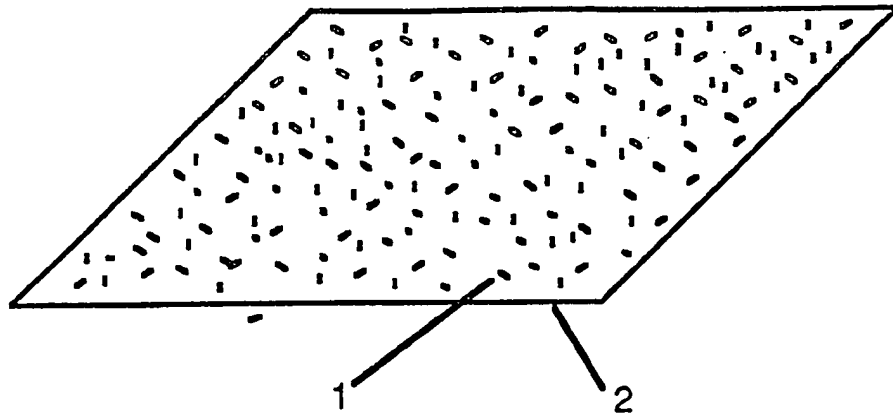


Fig. 1

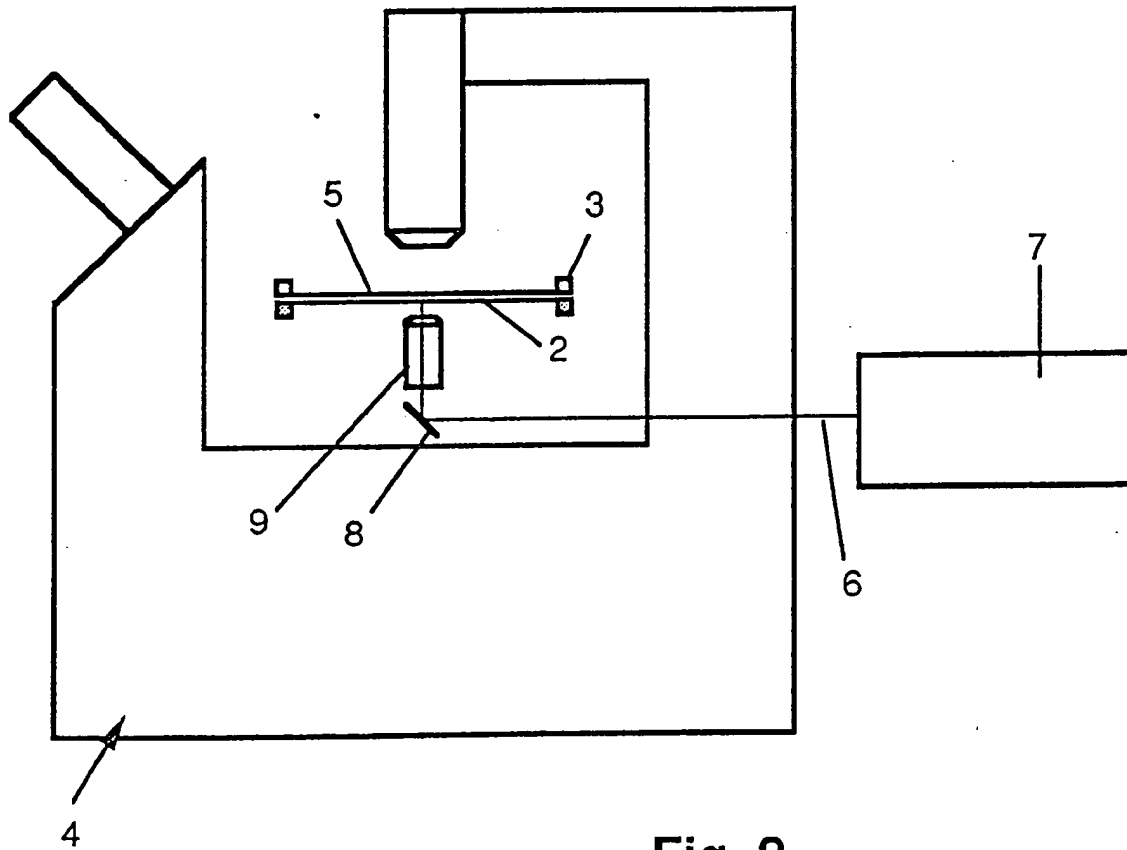


Fig. 2

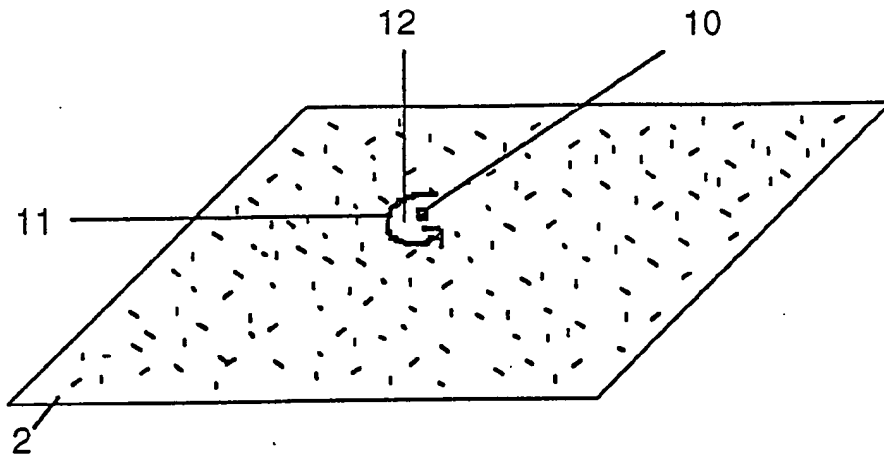


Fig. 3

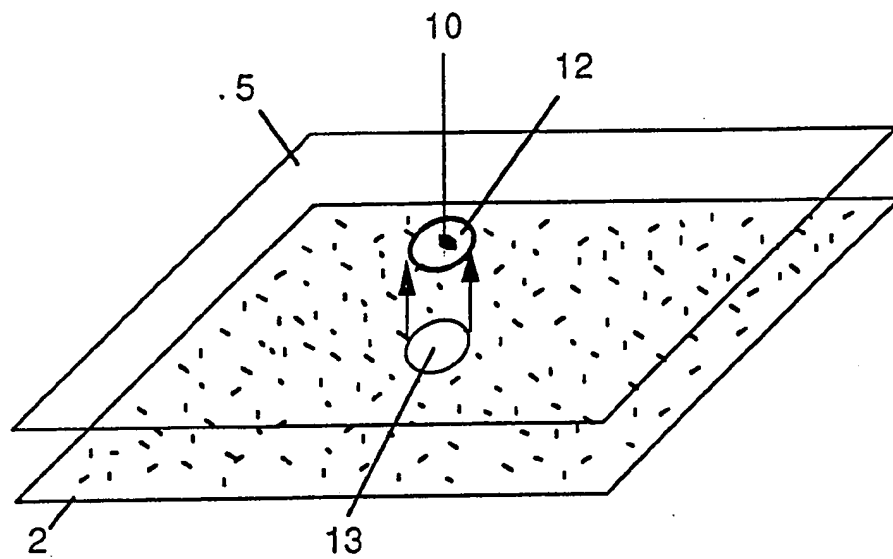


Fig. 4



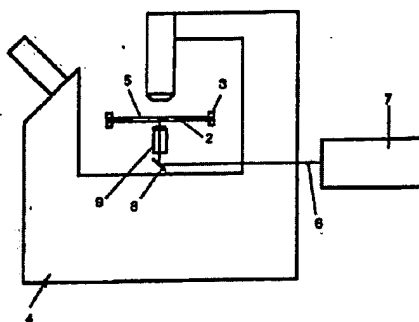
**Individual cells cut from polymer substrate foil****Publication number:** DE19603996**Publication date:** 1997-08-14**Inventor:** DIESEL EDGAR DR (DE); STEBANI JUERGEN DR (DE); REIHS KARSTEN DR (DE); SCHUETZE KARIN DR (DE)**Applicant:** BAYER AG (DE); PALM GMBH (DE)**Classification:**

- International: C12M1/26; G01N1/04; G01N1/28; G01N1/31; G01N15/14; C12M1/26; G01N1/04; G01N1/28; G01N1/30; G01N15/14; (IPC1-7): G01N1/04; B07C5/36; B23K26/00; C12M1/42; C12N13/00; C12Q1/00; G01N1/28; G01N33/48

- European: C12M1/26; G01N1/04; G01N1/28F

**Application number:** DE19961003996 19960205**Priority number(s):** DE19961003996 19960205[Report a data error here](#)**Abstract of DE19603996**

Process to separate and sort biological objects resting on a planar foil (2), the novelty is that: (a) the selected object field (12) is cut from the rest of the foil (2) by a UV-laser beam (6); (b) triggered by the laser beam action, the cut-out UV light-absorbing polymer foil section is then either lifted or lowered to a capture substrate (5), positioned above or below the planar foil (2); (c) the laser beam (6) describes an enclosed curved cutting pattern (12) around the biological object (10); (d) during cutting, the object field (12) is illuminated by the laser beam (6) through a slit-mask; (e) after the object field (12) has been cut out, the sample (10) is transported a distance of between 0.5-10 (preferably 1-3) mm to the collector substrate; (f) the diameter of the object field (12) is between 10-50  $\mu\text{m}$ .



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide